

LAMPIRAN A
KOMPOSISI PREMIX DAN KOMPOSISI PAKAN NORMAL BR₁

Premix (PT. Eka Farma, Medan)

Kandungan Premix	Komposisi
Kalsium	43-45 %
Fosfor	10-12 %
Ferrum	4,40 %
Cupprum	0,044 %
Manganese	0,397 %
Iodin	0,002 %
Sodium Chlorida	10 %
Magnesium	3,30 %
Zink	0,50 %
Cyanocobalamine	1,545 mcg

Pakan Normal BR₁ (PT.Charoen Pokphand, Sidoarjo)

Nutrien	Br ₁
Kadar Air (%)	13,0
Protein (%)	21,5-23,8
Lemak (%)	5,0
Serat (%)	5,0
Abu (%)	7,0
Ca (%)	0,9
P (%)	0,6
Energi Metabolis (kkal/kg)	3025-3125

LAMPIRAN B
DATA PENIMBANGAN BERAT BADAN
Berat Badan Kelompok Kontrol (gram)

Kontrol	21 April	28 April	5 Mei	12 Mei	19 Mei	26 Mei	2 Mei	9 Juni	16 Juni	20 Juni
1	179	231	253	274	304	311	319	341	352	360
2	206	233	242	233	270	277	284	298	305	310
3	171	197	189	196	232	241	251	261	266	275
4	222	254	263	276	294	298	304	316	326	341
5	217	221	237	256	272	277	283	293	299	313
6	196	206	218	234	238	242	247	260	276	279
7	238	238	243	260	282	286	291	302	308	320
8	222	233	249	266	276	287	299	310	318	324
<i>Rata- rata ±</i>	<i>206,37</i>	<i>226,62</i>	<i>236,75</i>	<i>249,37</i>	<i>271</i>	<i>277,37</i>	<i>284,75</i>	<i>297,62</i>	<i>306,25</i>	<i>315,25</i>
<i>SD</i>	<i>±23,02</i>	<i>±18,18</i>	<i>±23,30</i>	<i>±26,99</i>	<i>±25,00</i>	<i>±24,77</i>	<i>±24,93</i>	<i>±27,17</i>	<i>±27,29</i>	<i>±28,61</i>

Berat Badan Kelompok Diet Tinggi Fruktosa (gram)

Diet Tinggi Fruktosa	21 April	28 April	5 Mei	12 Mei	19 Mei	26 Mei	2 Juni	9 Juni	16 Juni	20 Juni
1	218	212	227	238	257	260	263	269	282	282
2	214	237	246	263	282	287	296	309	322	327
3	203	219	239	226	267	272	280	287	300	302
4	216	227	238	251	272	270	272	279	290	300
5	198	215	234	248	252	263	272	286	290	312
6	224	240	237	227	273	277	285	300	298	294
7	211	227	236	250	263	267	276	290	299	298
8	186	200	213	225	250	256	261	274	283	285
<i>Rata-rata</i>	<i>208,75</i>	<i>222,12</i>	<i>233,75</i>	<i>241</i>	<i>264,5</i>	<i>269 ±</i>	<i>275,62</i>	<i>286,75</i>	<i>295,5</i>	<i>300</i>
<i>± SD</i>	<i>±12,36</i>	<i>±13,31</i>	<i>±9,91</i>	<i>±14,14</i>	<i>11,12</i>	<i>9,91</i>	<i>±11,47</i>	<i>±13,19</i>	<i>±12,76</i>	<i>±14,47</i>

LAMPIRAN C

**HASIL ANALISIS STATISTIK DENGAN UJI *INDEPENDENT SAMPLES T-TEST* TERHADAP BERAT
BADAN TIKUS WISTAR JANTAN KELOMPOK KONTROL DAN DIET TINGGI FRUKTOSA**

Group Statistics

Kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
BB	Control	8	88,63	17,671	6,248
	tinggi fruktosa	8	77,88	13,590	4,805

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	T	Df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
BB	Equal variances assumed	,016	,900	1,364	14	,194	10,750	7,882	-6,154	27,654
	Equal variances not assumed			1,364	13,134	,196	10,750	7,882	-6,260	27,760

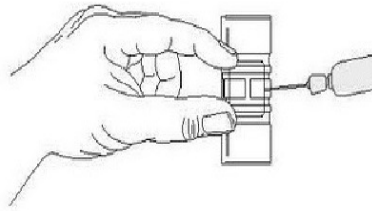
LAMPIRAN D
PEMERIKSAAN JUMLAH MAKROFAG PADA CAIRAN
PERITONEUM

Cairan plasma darah dikocok kira-kira 1 menit menggunakan aspirator dan pipet leko, dihisap plasma darah sampai tanda 0,5 pada pipet atau dilebihkan sedikit namun tidak boleh terlalu tinggi karena akan mempengaruhi hasil. Permukaan luar pipet dihapus dengan menggunakan *tissue* dan apabila plasma darah yang diambil lebih dari 0,5 maka digunakan bahan non absorben pada ujung pipet dan diturunkan darah sampai 0,5. Apabila yang digunakan adalah bahan yang mengabsorpsi, maka yang terhisap adalah cairannya saja, sehingga akan diperoleh hemokonsentrasi (kadar sel yang lebih tinggi).

Ujung pipet diletakkan pada cairan pelarut sel plasma darah secara vertikal agar tidak ada gelembung udara yang masuk, lalu dihisap perlahan-lahan sampai tanda yang tertera pada pipet. Apabila saat dihisap level darah tidak mencapai 0,5 maka harus diulangi menggunakan cairan pelarut yang baru. Berdasarkan bentuk pipet, darah terbagi menjadi 2 bagian, yaitu 1 unit pada bagian tabung pipet dan 10 unit ada di bagian gelembungnya. Jadi, saat darah dihisap dengan volume 0,5 unit ditambah cairan pelarut sampai tanda 11, darah yang ada gelembung yaitu 0,5 unit + 9,5 unit pelarut. Tabung bawah hanya berisi cairan pelarutnya dengan pengenceran darah adalah 0,5 unit : 10 unit (1 : 20). Spesimen dilakukan 2 kali dengan cara yang sama.

Gelas hitung dibersihkan dengan menggunakan alkohol 70%, lalu kocok larutan dengan menggunakan alat atau dengan cara manual kurang lebih 3 menit agar sel darah merah terhemolisa. Selanjutnya tabung hitung diisi dengan cara memegang pipet secara vertikal dan jari telunjuk kanan

menutup puncak pipet lalu teteskan 4 tetes campuran. Hilangkan cairan yang mungkin menempel di luar pipet. Letakkan ujung pipet pada tepi kamar hitung dan biarkan cairan mengalir di bawah gelas penutup pelan-pelan sampai memenuhi kamar hitung, dengan menggunakan jari telunjuk tangan kanan sebagai pengontrol kecepatan dan pipet langsung ditarik sesaat sebelum kamar hitung tampak penuh. Gelas penutup yang digunakan tidak boleh bergeser dari posisi semula. Pemeriksaan ini harus segera dilakukan untuk menghindari pengendapan dan apabila pengisian kamar hitung tidak sempurna, maka prosedur harus diulangi. Setelah itu, larutan kedua diisi pada bagian yang berlawanan dari kamar hitung lalu beri waktu 1 menit agar makrofag mengendap sebelum diperiksa di bawah mikroskop.

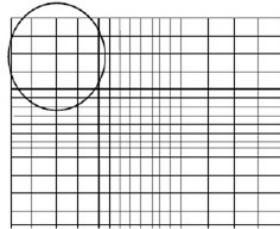


Gambar D.1 Penggunaan Hemositometer (Swenson, 1984)

Posisi kamar hitung harus selalu horizontal saat melakukan pengamatan di bawah mikroskop menggunakan perbesaran 400x dan dengan fokus tertentu sel makrofag harus tampak jelas. Cara untuk memastikan hasil yang akurat yaitu pada 4 bagian kamar hitung dengan kode “W” harus mempunyai jumlah sel makrofag yang selisihnya tidak lebih dari 10 pada setiap kamar hitung. Perhitungan jumlah sel makrofag dilakukan pada keempat bidang, dimulai dari bidang kiri atas dan perhitungn untuk sel yang ada di tepi hanya dilakukan terhadap sel-sel yang menempel pada tepi kiri dan atas saja. Perhitungan juga dilakukan dari tepi

yang berlawanan dan hasilnya harus sama. Apabila hasil tidak sesuai maka prosedur harus diulang lagi.

Apabila terdapat sel-sel yang menempel pada garis batas, maka perhitungan hanya dilakukan terhadap sel-sel yang berada di kiri dan atas sedangkan sel-sel yang berada di kanan dan di bawah tidak dihitung. Perhitungan juga dapat dilakukan sebaliknya yaitu hanya menghitung sel-sel yang berada di kanan dan bawah, sedangkan sel-sel yang berada di kiri dan atas tidak dihitung.



Gambar D.2 Grid Hemositometer (Swenson, 1984)

Perhitungan dapat dilakukan dengan cara mengalikan jumlah sel makrofag dengan koreksi isi dan koreksi pelarut. Contoh : jumlah makrofag yang terhitung dari ke empat bidang sebanyak 100 sel, volume makrofag yang terhitung untuk setiap bidang = $1 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$, maka untuk 4 bidang = $4 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 0,4 \text{ mm}^3$. Satuan yang digunakan untuk jumlah makrofag adalah ml, jadi untuk menjadikan ml maka $1 / 0,4 = 2,5$, sehingga faktor koreksi untuk volume adalah = **2,5**. Karena pengenceran darah adalah 1 : 20, maka artinya adalah faktor koreksi untuk pelarut = **20**. Jadi, jumlah makrofag adalah = **$100 \times 2,5 \times 20 = 4000 \text{ sel/ml}$** . Perhitungan untuk sebelah yang berlawanan juga dilakukan seperti contoh (Hansen, 2000).

LAMPIRAN E
HASIL PERHITUNGAN JUMLAH MAKROFAG (sel/mm³)

Kontrol	Jumlah Makrofag	Diet Tinggi Fruktosa	Jumlah Makrofag
1	3150	1	3050
2	2900	2	5300
3	2800	3	4250
4	2350	4	3300
5	3000	5	3500
Rata-rata kelompok kontrol±SD	2840±302,90	Rata-rata kelompok diet tinggi fruktosa±SD	3880±911,45

Perhitungan persentase peningkatan jumlah makrofag kelompok diet tinggi fruktosa dibandingkan dengan kelompok kontrol :

$$\frac{\text{Rerata kelompok diet tinggi fruktosa} - \text{Rerata kelompok kontrol}}{\text{Rerata kelompok diet tinggi fruktosa}} \times 100 \%$$

$$\frac{3880 - 2840}{3880} \times 100\% = 26,80\%$$

LAMPIRAN F

**HASIL ANALISIS STATISTIK DENGAN UJI *INDEPENDENT SAMPLES T-TEST* TERHADAP JUMLAH
MAKROFAG TIKUS WISTAR JANTAN KELOMPOK KONTROL DAN DIET TINGGI FRUKTOSA**

Group Statistics

kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
makrofag	kontrol	5	2840.00	302.903	135.462
	TF	5	3880.00	911.455	407.615

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
makrofag	Equal variances assumed	5.632	.045	-2.421	8	.042	-1040.000	429.535	-2030.509	-49.491
	Equal variances not assumed			-2.421	4.873	.061	-1040.000	429.535	-2152.873	72.873

LAMPIRAN G
PEMERIKSAAN KADAR SITOKIN (TNF- α) PADA PLASMA
DARAH

Persiapan pembuatan reagen dan sampel dimulai dari pembuatan *Wash Buffer*. *Wash Buffer* yang tersedia adalah *Wash Buffer* 20 x, sedangkan yang akan digunakan adalah *Wash Buffer* 1x sehingga dilakukan pengenceran untuk 1 liter dari *Wash Buffer* 1 x. Pengenceran dilakukan dengan mengambil *Wash Buffer* 20 x sebanyak 50 ml lalu dicampurkan dengan 950 ml air terdeionisasi. Apabila kristal telah terbentuk, maka dikondisikan pada suhu kamar lalu vortex sampai larut.

Standard Stock Solution dibuat dengan mencampurkan 20 mg/ml standard TNF- α dan 1 ml *Assay Buffer A* lalu dirotasikan kemudian didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Pembuatan *Matrix A* juga dilakukan dengan mencampurkan *Matrix A* dan 2 ml air terdeionisasi pada vial, dirotasikan dan didiamkan selama 15 menit pada suhu ruang.

Secara umum, kultur sel supernatan sampel dianalisis tanpa pengenceran, tetapi jika diperlukan maka gunakan kultur medium atau *Assay Buffer A* sebagai pengenceran sampel. Pengukuran serum atau plasma sampel memerlukan pengenceran 2 kali lipat dari sampel dengan penambahan *Assay Buffer A*. Contohnya, 50 μ l *Assay Buffer A* (Jika dibutuhkan pengenceran lebih lanjut, sampel diencerkan dengan *Matrix A*). Pengujian kadar sitokin (TNF- α) dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Reagen yang akan digunakan dikondisikan dalam suhu ruang, kemudian disiapkan kurva *standard* lalu semua perlakuan dibuat dalam duplikasi atau triplikasinya.

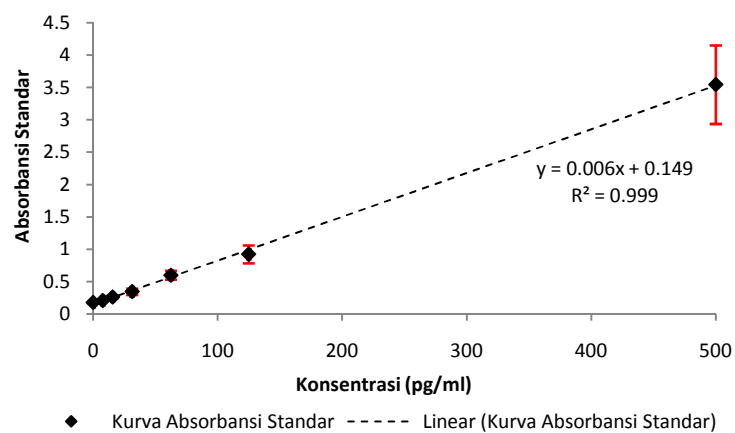
2. Apabila ada strip yang tidak dipakai, dilepaskan dari *microplate*, dikembalikan dan di-*seal* kembali.
3. Pengenceran standar dilakukan dengan mempersiapkan 500 μ l dari 500 pg/ml *top standard* dengan mengencerkan 12,5 μ l *standard stock solution* ke dalam 487,5 μ l *Assay Buffer A*. Dua kali pengenceran dari 500 pg/ml *top standard* dilakukan sebanyak 6 seri di tabung yang berbeda dan menggunakan *Assay Buffer A* sebagai pengencer. Jadi, konsentrasi TNF- α di dalam tabung adalah 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml dan 7,8 pg/ml. *Assay Buffer A* bertindak sebagai standar nol (0 pg/ml).
4. Plate dicuci dengan menggunakan *Wash Buffer* sebanyak 4 kali dengan 1 kali pencucian sebanyak 300 μ l pada setiap sumuran. Apabila terdapat sisa *Wash Buffer* didalam sumuran, maka dibuang dengan cara membalikkan *plate* lalu menepuknya pada selembar *tissue*.
5. Sampel plasma diukur dengan menambahkan 50 μ l matrix A ke dalam setiap sumuran yang akan mengandung pengenceran *standard*, kemudian pengenceran dilakukan dengan menambahkan 50 μ l *standard* ke dalam sumuran tersebut. Setiap sumuran yang akan mengandung sampel ditambahkan dengan 50 μ l *Assay Buffer A* lalu dipipet 50 μ l sampel plasma ke dalam sumuran tersebut.
6. *Plate* ditutup rapat dengan *plate sealer* yang tersedia di dalam *kit* lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu ruang dengan *shaking* (200 rpm).
7. Isi di dalam *plate* dibuang, kemudian dilakukan pencucian *plate* dengan menggunakan *Wash Buffer* seperti pada tahap 4.

8. Setiap sumuran ditambahkan *solution antibody* TNF- α sebanyak 100 μ l lalu *plate* ditutup dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang dengan *shaking*.
9. Isi di dalam *plate* dibuang, kemudian dilakukan pencucian *plate* dengan menggunakan *Wash Buffer* seperti pada tahap 4.
10. Setiap sumuran ditambahkan dengan *solution* avidin-HRP sebanyak 100 μ l lalu *plate* ditutup dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dengan *shaking*.
11. Isi di dalam *plate* dibuang, kemudian dilakukan pencucian *plate* dengan menggunakan *Wash Buffer* seperti pada tahap 4. Pencucian terakhir dilakukan dengan merendam setiap sumuran dalam 1x *Wash Buffer* selama 30 detik sampai 1 menit. Hal ini bertujuan untuk membantu meminimalisir *background*.
12. Setiap sumuran ditambahkan dengan substrat *solution* F sebanyak 100 μ l lalu *plate* ditutup dan diinkubasi selama 15 menit dalam gelap. Sumuran yang mengandung TNF- α tikus akan mengalami perubahan warna menjadi biru berbanding lurus dengan konsentrasi.
13. Setiap sumuran ditambahkan dengan *stop solution* (2N asam sulfat) sebanyak 100 μ l dan warna *solution* akan berubah menjadi kuning.
14. Pembacaan dilakukan pada *microplate reader* dengan panjang gelombang 450 nm dalam rentang waktu tidak boleh lebih dari 30 menit dan dikoreksi pada panjang gelombang 570 nm (Biolegend, 2012).

LAMPIRAN H
LINEARITAS BAKU STANDAR TNF- α

Konsentrasi (pg/ml)	Absorbansi Standar		Rata-rata \pm SD
	Rep 1	Rep 2	
500	3,977	3,118	3,54 \pm 0,60
125	0,826	1,021	0,92 \pm 0,13
62,5	0,553	0,649	0,60 \pm 0,06
31,3	0,311	0,382	0,34 \pm 0,05
15,6	0,246	0,278	0,26 \pm 0,02
7,8	0,207	0,212	0,20 \pm 0,003
0	0,167	0,185	0,17 \pm 0,01

Grafik Absorbansi Standar



LAMPIRAN I
HASIL PERHITUNGAN KONSENTRASI TNF- α (pg/ml)

Kontrol

Absorbansi		Konsentrasi TNF- α (pg/ml)
Replikasi 1	Replikasi 2	
0,201	0,221	9,08
0,269	0,212	13,44
0,297	0,280	20,53
0,204	0,194	7,31
Rata-rata\pmSD		12,59\pm5,88

Diet Tinggi Fruktosa

Absorbansi		Konsentrasi TNF- α (pg/ml)
Replikasi 1	Replikasi 2	
0,236	0,239	13,00
0,226	0,214	10,41
0,355	0,357	30,51
0,268	0,227	14,47
Rata-rata\pmSD		17,10\pm9,09

Perhitungan persentase peningkatan jumlah TNF- α pada kelompok diet tinggi fruktosa dibandingkan dengan kelompok kontrol :

$$\frac{\text{Rerata kelompok diet tinggi fruktosa} - \text{Rerata kelompok kontrol}}{\text{Rerata kelompok diet tinggi fruktosa}} \times 100 \%$$

$$\frac{17,10 - 12,59}{17,10} \times 100\% = 26,37\%$$

LAMPIRAN J
HASIL PERHITUNGAN *INDEPENDENT SAMPLES T-TEST* TERHADAP KADAR TNF- α TIKUS WISTAR
JANTAN KELOMPOK KONTROL DAN DIET TINGGI FRUKTOSA

Group Statistics

kelompok		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TNFalpha	kontrol	4	12.5943	5.88917	2.94458
	TF	4	17.1016	9.09711	4.54856

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	T	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
TNFalpha	Equal variances assumed	.672	.444	-.832	6	.437	-4.50731	5.41848	-17.76586	8.75124
	Equal variances not assumed			-.832	5.139	.442	-4.50731	5.41848	-18.32352	9.30890

LAMPIRAN K
SERTIFIKAT TIKUS

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Heri Soemantoro
NIP : 196302021988031002

Menerangkan bahwa :

Nama : Putri Septiani Widia Fanda
Pekerjaan : Mahasiswa

Telah membeli tikus jantan (*Rattus norvegicus L.*) usia 3 bulan sejumlah 40 ekor dalam keadaan sehat dari Kandang Hewan coba Biokimia Kedokteran FK Unair

Demikian surat keterangan ini dibuat agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Atas kerjasama yang baik diucapkan terima kasih.

Surabaya, 19 April 2013

Koordinator



LAMPIRAN L
SERTIFIKAT *ETHICAL CLEARANCE*

	
KOMISI ETIK PENELITIAN FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA <i>Animal Care and Use Committee (ACUC)</i>	
KETERANGAN KELAIKAN ETIK " <i>ETHICAL CLEARANCE</i> "	
No : 296-KE	
KOMISI ETIK PENELITIAN (<i>ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE</i>) FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA, TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA :	
PENELITIAN BERJUDUL	: Pengaruh Diet Tinggi Fruktosa Rendah Magnesium Terhadap Jumlah Makrofag, Netrofil dan Kadar Sitokin Dalam Darah Tikus Putih
PENELITI UTAMA	: Ratna Megawati
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT PENELITIAN	: Universitas Katholik Widya Mandala Surabaya
DINYATAKAN	: LAIK ETIK
Surabaya, 29 Mei 2013	
Mengetahui, Dekan FKH-Unair,  Prof. Romziah Sidik, Ph.D.,drh. NIP. 195312161978062001	Ketua,  Dr. E. Bimo Aksono, M.Kes.,Drh. NIP. 196609201992031003